

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号

第 2 7 6 1 5 4 3 号

(45)発行日 平成10年(1998)6月4日

(24)登録日 平成10年(1998)3月27日

(51)Int. Cl.<sup>6</sup> 識別記号  
C 0 7 K 16/32  
C 1 2 N 5/10  
// A 6 1 K 39/395 A D U  
C 1 2 N 15/02  
C 1 2 P 21/08

F I  
C 0 7 K 16/32  
A 6 1 K 39/395 A D U T  
C 1 2 P 21/08  
G 0 1 N 33/574 Z  
33/577 B

請求項の数 8

(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平 1 - 1 7 7 3 9 2  
(22)出願日 平成1年(1989)7月10日  
(65)公開番号 特開平 2 - 1 5 0 2 9 3  
(43)公開日 平成2年(1990)6月8日  
審査請求日 平成7年(1995)12月6日  
(31)優先権主張番号 特願昭 6 3 - 2 0 4 2 0 7  
(32)優先日 昭 6 3 ( 1 9 8 8 ) 8 月 1 7 日  
(33)優先権主張国 日本 ( J P )  
微生物の受託番号 FERM P-10197  
微生物の受託番号 FERM P-10162  
微生物の受託番号 FERM P-10777

(73)特許権者 999999999  
味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目15番1号  
(73)特許権者 999999999  
株式会社ニチレイ  
東京都中央区築地6丁目19番20号  
(72)発明者 山本 雅  
神奈川県横浜市港南区日野6丁目11-20-403  
(72)発明者 橋本 嘉幸  
宮城県仙台市太白区三神峯1丁目3-3-506  
(72)発明者 益子 高  
宮城県仙台市太白区太白2丁目9-3-202  
(74)代理人 弁理士 谷川 英次郎

審査官 小暮 道明

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト癌原遺伝子産物に対するモノクローナル抗体及びそれを産生するハイブリドーマ

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト癌原遺伝子erbB-2産物を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とした動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞と融合して得られたハイブリドーマによって産生され、ヒト癌原遺伝子erbB-2産物を対応抗原とするモノクローナル抗体。

【請求項 2】 IgM亜群に属し、SV-11細胞とは反応するがNIH3T3細胞とは反応しない請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】 IgG亜群に属し、SV-11細胞とは反応するがNIH3T3細胞とは反応しない請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】 微工研菌寄第10162号の受託番号で寄託されたハイブリドーマにより産生される請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

2

【請求項 5】 微工研菌寄第10777号の受託番号で寄託されたハイブリドーマにより産生される請求項 3 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】 請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載されたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 7】 微工研菌寄第10162号の受託番号で寄託された請求項 6 記載のハイブリドーマ。

【請求項 8】 微工研菌寄第10777号の受託番号で寄託された請求項 6 記載のハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

この発明は、新規なモノクローナル抗体及びそれを産生するハイブリドーマに関する。この発明のモノクローナル抗体はヒト腺癌、特に乳癌、胃癌等の診断、治療薬として用いることができる。

### 〔従来の技術〕

癌の診断、治療法の開発のためにこれまで多方面から研究が進められてきた。細胞の癌化は染色体DNAに傷がつく等の異常が出発点となっていることが明らかになりつつある。DNAの異常は大きく2つに分けることができる。1つはその異常のために特定の遺伝子の機能が欠損し、その結果として細胞が癌化する異常であり、他方は特定の遺伝子の機能を細胞の癌化に都合の良いように変えてしまう異常である。後者の異常の原因になっているのが癌遺伝子と呼ばれる。これまで約40種類知られている特定の遺伝子がある。

ニワトリに感染して癌をつくる代表的なウイルスにラウス肉腫ウイルスがあり、1911年に発見されている。このウイルスの発癌能がウイルスのゲノム上にあるsrc遺伝子によることが分かったのは比較的最近である。

その後、今日まで癌研究の分野で飛躍的な進展が見られるが、その1つにsrcと相同な遺伝子がニワトリ正常細胞の染色体上に存在することが1976年にディー・ステーリンらによって見出された。その他数多くのRNA腫瘍ウイルスについての分子生物学的解析からyes、erbB、fps、abl、ras等の癌遺伝子が同定されたが、これらのウイルスの癌遺伝子はsrc同様全て細胞由来癌原遺伝子（以下c-oncとする）に由来することが示された。

普段正常細胞内に存在している限りでは、発癌活性を示さない遺伝子c-oncがRNA腫瘍ウイルスのゲノムに取り込まれて発現することにより癌遺伝子としての性質を示す。

正常な細胞は分化と増殖によって生命体を維持する機能を担っているが、これらの癌原遺伝子は細胞の分化、繁殖に溶接につながっている遺伝子であることもわかっており、癌化のメカニズムに直接関連した癌の診断及び治療法の開発につながることが期待される。

本発明者らは癌原遺伝子（c-onc）の機能を探るために分子生物学的手法を用いて研究を行ってきた。既に報告したようにヒト細胞由来癌原遺伝子（ヒトc-erbBの遺伝子クローニングに続き、新たなヒト癌原遺伝子erbB-2（以下、ヒトc-erbB-2とする）（Sembaら、PNAS 82,6497（1985）、Yamamotoら、Nature 319,230（1986）を発見した。

ヒトc-erbB-2は後に上皮成長因子（EGF）の受容体の遺伝子に由来することがわかったヒトc-erbBと極めて相同性が高い遺伝子であり、その遺伝子産物はタンパク質のチロシン残基を特異的にリン酸化するチロシンキナーゼ活性を有している。ヒトc-erbB-2もヒトc-erbBと同様、細胞表面に存在する受容体の一種と考えられているが、今日までそのリガンドは同定されていない。しかし、チロシンキナーゼ活性を有する増殖因子受容体の過剰発現が癌の発症に何らかの役割を果たしている可能性は十分に考えられる。この見地から本発明者らは手術時の摘出癌組織からDNAを調製し、c-erbB-2

遺伝子に特異的なDNAとのハイブリッド形成法により予測の確認実験を行なった。その結果、ヒトc-erbB-2遺伝子は胃癌、乳癌等の腺上皮癌の2割程に増幅が見られた。このことはヒトc-erbB-2が腺癌の発症、進展に寄与しており、腺癌の診断に必要な情報を提供することを意味している。

erbB-2の発現機能に関してはWeinbergらのラットc-erbB-2遺伝子（以下neuとする）（Science 235,177,（1984）、Nature 319,226（1986）、Nature 319,230（1986）、Cell 45,649（1986））が点変異を獲得したものであることがわかったが、neuは新生ラットに化学発癌剤であるエチルニトロソウレアを投与して誘発した腫瘍から培養細胞癌化能を持つ遺伝子として見出された。

erbB-2の腫瘍組織での異常発現はDNA検出法でもコピー数増大の診断情報を得ることができるが、この方法は癌診断法としては一般的でなく、得られている情報もDNAレベルのものに限定されている。

もし、ヒトc-erbB-2の遺伝子産物を対応抗原とするモノクローナル抗体を得ることができれば、乳癌や胃癌等の腺癌の診断、治療に有利に用いることができる。

### 〔発明が解決しようとする課題〕

従って、この発明の目的は、ヒトc-erbB-2の遺伝子産物を対応抗原とするモノクローナル抗体及びそれを産生するハイブリドーマを提供することである。

### 〔課題を解決するための手段〕

抗原が単離されている場合には、それを抗原として用いてケーラーとミルシュタインの常法に従い、その抗原を対応抗原とするモノクローナル抗体を作製することは比較的容易であるが、ヒトc-erbB-2の遺伝子産物は未だ単離されていないので、これを対応抗原とするモノクローナル抗体の作製は容易ではない。そこで、本願発明者らは、鋭意研究の結果、ヒトc-erbB-2遺伝子を含むベクターを開発し、このベクターでマウス胎児由来の腺維芽細胞を形質転換して、ヒトc-erbB-2遺伝子を高率に発現する細胞を作製することに成功し（ヒトc-erbB-2遺伝子産物は細胞膜上に存在する）、これを免疫原として免疫した動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合してヒトc-erbB-2遺伝子産物を対応抗原とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製することに成功し、この発明を完成した。

すなわち、この発明は、ヒトc-erbB-2産物を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とした動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞と融合して得られたハイブリドーマによって産生され、ヒトc-erbB-2遺伝子産物を対応抗原とするモノクローナル抗体及びこれを産生するハイブリドーマを提供する。

### 〔発明の効果〕

この発明により、ヒトc-erbB-2産物を細胞表面上

に発現する細胞を免疫原とした動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞と融合して得られたハイブリドーマによって產生され、ヒト c-erbB-2 遺伝子産物を対応抗原とする新規なモノクローナル抗体及びこれを產生する新規なハイブリドーマが提供された。この発明のモノクローナル抗体は、癌原遺伝子であるヒト c-erbB-2 遺伝子の産物を対応抗原とするものであり、また、上述のように、ヒト c-erbB-2 遺伝子は腺癌患者において増幅される場合が有意に存在するので、この発明のモノクローナル抗体を用いてヒト c-erbB-2 遺伝子の発現をチェ

#### 〔発明の具体的説明〕

上述したように、この発明のモノクローナル抗体はヒト c-erbB-2 遺伝子産物を対応抗原とするものであり、これと特異的に抗原抗体反応を行なう。この発明のモノクローナル抗体は、従来単離されていない物質を対

この発明のモノクローナル抗体は以下のようにして得ることができる。

まず、ヒト c-erbB-2 遺伝子をベクターに組込んだ組換えDNAであって、動物細胞内で増殖することができる、かつ動物細胞を形質転換することができるものを調製する。本発明者らは、ベクターとしてpBR322を選び、このベクターに4409塩基対のヒト c-erbB-2 遺伝子のDNA（第38番目の塩基～第4466番目の塩基）にHind IIIリンカーを接続し、この前後にSV-40転写プロモーター（SV ori領域270～5171の塩基配列）とポリAシグナル部分を含むSV-40 DNAの1782～2771と4100～4710の塩基配列を組込んだpSVerB2と呼ぶ組換えDNAを構築することにより行なった。なお、pSVerB2遺伝子地図を第1図に示す。

次にこのようにして得られた組換えDNAを適当な動物細胞、例えばマウス胎児由来の線維芽細胞に導入してその動物細胞を形質転換し、ヒト c-erbB-2 遺伝子を発現している細胞を選択することにより、この発明のモノクローナル抗体を作製するための免疫原として用いることができ、ヒト c-erbB-2 遺伝子をその細胞表面に発現している細胞を得ることができる。本発明者らは、上記pSVerB2を常法に従ってカルシウム沈殿法により、マウス胎児由来の線維芽細胞NIH/3T3（ATCC株番号CRL-1658）に導入し、スクリーニングによりSV-11株を樹立した。SV-11株は工業技術院微生物工業技術研究所（微工

研）に寄託され、その受託番号は微工研菌寄第10197号である。

次に、このようにして作製した細胞を免疫原として用いて免疫した動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを常法により融合してハイブリドーマを作製し、ヒト c-erbB-2 遺伝子産物を対応抗原とするモノクローナル抗体を產生しているハイブリドーマを選択する。この選択は、例えば、常法に従って蛍光抗体法により細胞株SV-11に陽性であり、かつSV-11の野生株であるNIH3T3に陰性の抗体を產生しているハイブリドーマを選択することにより行なうことができる。

この発明のモノクローナル抗体はこのようにして得られたハイブリドーマを培養し、その培養上清から回収することができる。

#### 〔実施例〕

以下、この発明を実施例に基きより具体的に説明する。なお、この発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

#### モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

##### (i) SV-11株の作製

ヒト c-erbB-2 遺伝子を高発現する細胞株を得るためには、本発明者らは、動物細胞発現ベクターpSV2を選び、このベクターに c-erbB-2 遺伝子を組み込んだDNAを調製した。このベクターはSV40ウイルスの転写プロモーター（SV40 ori領域270～5171塩基配列）とポリAシグナル部位（SV40 DNAの1782～2771と4100～4710の塩基配列）を有し、これにヒト c-erbB-2 遺伝子のcDNAからSma I及びAha3で切り出してきた c-erbB-2 遺伝子断片にHind IIIリンカーを接続したものを転写プロモーターの下流のHind III部位に組み込むことにより構築した。このベクターをpSVerbB-2と呼び、その遺伝子地図を第1図に示した。

次に、得られた組換えDNA pSVerbB-2をマウス胎児由来の線維芽細胞NIH3T3（ATCC株番号CRL-1658）細胞にリン酸カルシウム法を用いて導入して形質転換細胞を得た。形質転換NIH3T3細胞からDNAハイブリダイゼーション法でヒト c-erbB-2 遺伝子発現株をスクリーニングすることによりSV-11株（微工研菌寄10197号）を樹立した。

##### (ii) マウスの感作

上記細胞株SV-11を10%ウシ胎児血清添加DMF培地で培養し、0.05%EDTAで細胞をはがし取り、リン酸緩衝食塩水で5回洗浄し、遠心分離（1000rpm x 5分）で細胞を集め、細胞数を調製したものをを用いた。

免疫操作は4週令のBALB/c雄マウスの尾静脈に1 x 10<sup>7</sup>個の細胞株SV-11を静脈注射し、その後2週間の間隔で、2～4回尾静脈又は腹腔内に1 x 10<sup>7</sup>個の細胞株SV-11を追加免疫した。免疫の過程で、免疫原に対する抗体価の上昇を追跡した。

## (iii) 細胞融合

最終免疫より3日後に抗体価の高いマウスから脾細胞を無菌的に取り出し、ステンレスメッシュで単細胞にほぐし、脾細胞の1/10量の8-アザグアニン耐性骨髓腫細胞X-63 (Kohler G.とMilstein C, Nature 256, pp.495-497 (1975)、ATCCより入手)を混合し、洗浄塩沈後、細胞のペレットに1mlの50%ポリエチレングリコール(平均分子量1500)を加えて注意深く細胞融合操作を行なった。

その後融合細胞96穴マイクロプレートに $1 \times 10^4$ 個の割合で0.1mlづつ分注した。各マイクロプレートは5%O<sub>2</sub>、37°C (100% RH)のインキュベーターで無血清培地選択法で注意深く培養を続け、ハイブリドーマを得た。

(iv) このようにして選ばれたハイブリドーマは直ちに限界希釈法によりクローニングを繰り返した。5回のクローニングにより安定したハイブリドーマの培養上清をヒト正常末梢血中の細胞と反応させ、リンパ球、単球とそれぞれ陰性のクローンを選びSV2-61及びSV2-61 $\gamma$ と命名した。モノクローナル抗体SV2-61及びSV2-61 $\gamma$ を産生するハイブリドーマ(ハイブリドーマSV2-61及びハイブリドーマSV2-61 $\gamma$ )はBALB/cマウスを用いてブレステンによる常法による腹水を作製した。ハイブリドーマSV2-61及びハイブリドーマSV2-61 $\gamma$ は微工研に寄託し、その受託番号はそれぞれ微工研菌寄第10162号及び微工研菌寄第10777号である。

## 実施例 2

モノクローナル抗体SV2-61及びSV2-61 $\gamma$ の特徴づけ

## (i) 免疫グロブリンのサブクラス

モノクローナル抗体SV2-61及びSV2-61 $\gamma$ の免疫グロブリンのサブクラスはオクタロニー法によりそれぞれマウスIgM、マウスIgGと決定された。

## (ii) 特異性の決定

上記のようにして得られたモノクローナル抗体SV2-61及びSV2-61 $\gamma$ は免疫原SV-11に陽性であり、野生株NIH3T3に陰性であった。これは、具体的には以下のようにして試験した。すなわち、マイクロプレートで予め培養した $2 \times 10^3$ 個のSV-11細胞をマイクロプレートに付着させ、フォルマリンPBSで固定した。次いで細胞に培養上清を20 $\mu$ l加え、マイクロプレート上で常法に従い蛍光抗体法を行ない、陽性ハイブリドーマをスクリーニングした。陽性細胞はさらに $10^4$ 個の細胞に対して常法により蛍光抗体法でフローサイトメトリー測定を行なった。結果は第2図及び第3図のフローサイトグラムに示されている。第2図は、モノクローナル抗体SV2-61についての結果を示し、第3図はモノクローナル抗体SV2-61 $\gamma$ についての結果を示す。なお、第2図及び第3図中、Nは陰性ピークを、Pは陽性ピークを示す。

同様に、胃癌組織から樹立され、erbB-2が約30コピー発現していることが知られている樹立細胞株MKN-7 (文献:S.Fukushigeら, Molecular and Cellular B

iology, Mar. 955 (1986)、東京大学医化学研究所制癌部より入手)でも陽性であった。

## (iii) 抗原の分子量

抗原の分子量は、免疫沈降と電気泳動を組み合わせた方法により決定した。用いた細胞は、NIH3T3、SV-11、c-erbB-2遺伝子発現株であるSV227及び上記MKN-7細胞であった。6cmシャーレ中でコンフルエント状態にある細胞を、メチオニンフリーのDMEM及び100 $\mu$ Ciの<sup>35</sup>S-メチニオンで4時間培養することによって細胞を<sup>35</sup>S-メチニオンで標識し、これをRIPAバッファーで可溶可した。これにモノクローナル抗体SV2-61又はSV2-61 $\gamma$ を加え、氷冷下で反応させた後、プロテインA-セファロース(登録商標)で沈降させた。電気泳動は8%ポリアクリルアミドゲルで、30mAで約2時間泳動し、ゲルを乾燥した後、オートラジオグラフィーを行なった。

その結果、モノクローナル抗体SV2-61又はSV2-61 $\gamma$ と抗原抗体反応するタンパク質は分子量185kDの位置に一本のバンドとして確認された。すなわち、MKN-7、SV227及びSV-11細胞では185kDの位置にメインバンドが見られた。これはヒトc-erbB-2遺伝子の塩基配列から予測される抗原の分子量と一致していた。一方、陰性コントロールとして、NRS正常ウサギ血清で同様の操作を行なったが、185kDにバンドが見られなかった。

## (iv) チロシンキナーゼ活性

SV-11細胞をモノクローナル抗体SV2-61で免疫沈降したところ分子量185kDの位置にチロシンキナーゼ活性が確認された。このことよりモノクローナル抗体SV2-61がc-erbB-2遺伝子産物を抗原として反応していることが示された。

## 実施例 3

## 腺癌の診断

各種癌患者の外科手術時に摘出された腫瘍組織を本発明のモノクローナル抗体SV2-61を用いる組織染色法(ホルマリン固定パラフィン切片利用)で染色した結果を表に示す。表より、モノクローナル抗体SV2-61は腺癌と特異的に反応しており、腺癌の診断に優れた性能を有するモノクローナル抗体であることがわかる。

表

被検癌組織	検体数	陽性	
		検体数	陽性率(%)
食道癌	4	3	75
胃癌	11	2	18
脾臓癌	1	1	100
腎癌	3	1	33
膀胱癌	5	2	40

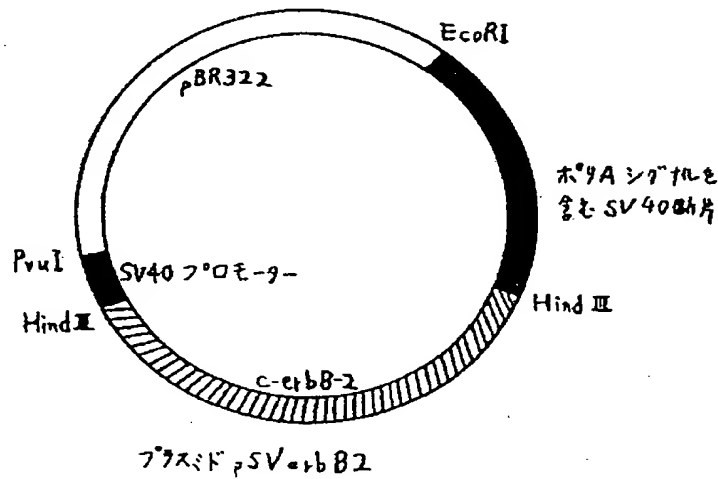
## 【図面の簡単な説明】

第1図は、この発明のモノクローナル抗体を作製するた

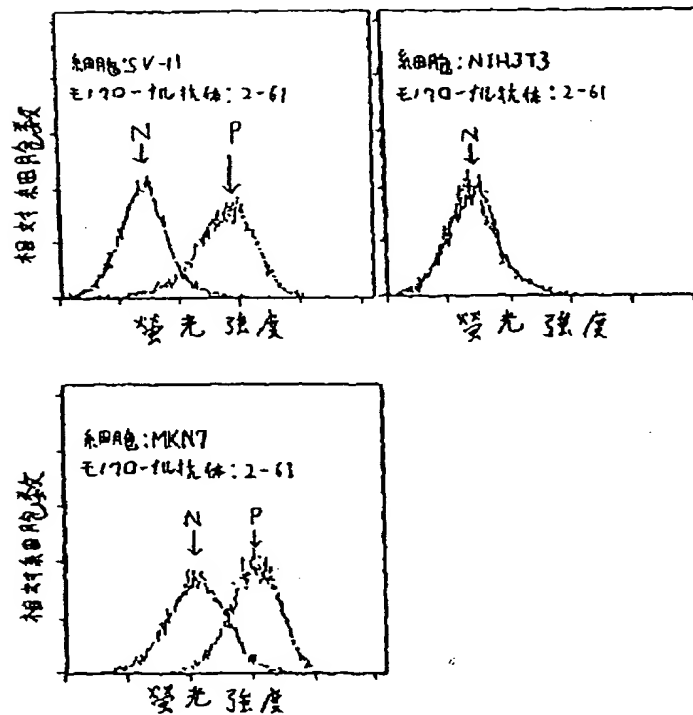
めに用いた組換え体DNAであるpSVerbB2の遺伝子地図、  
第2図は、この発明のモノクローナル抗体SV2-61の反  
応性を示すフローサイトグラム、

第3図は、この発明のモノクローナル抗体SV2-61の  
反応性を示すフローサイトグラムである。

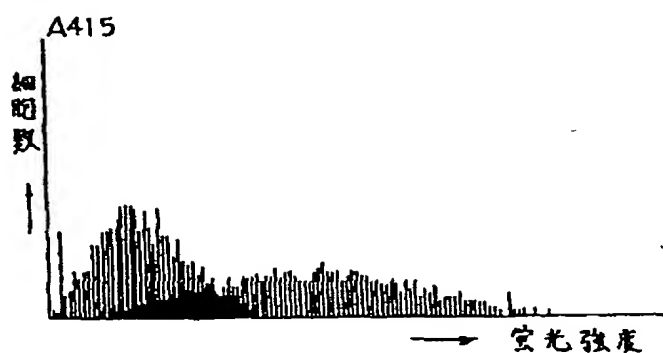
【第1図】



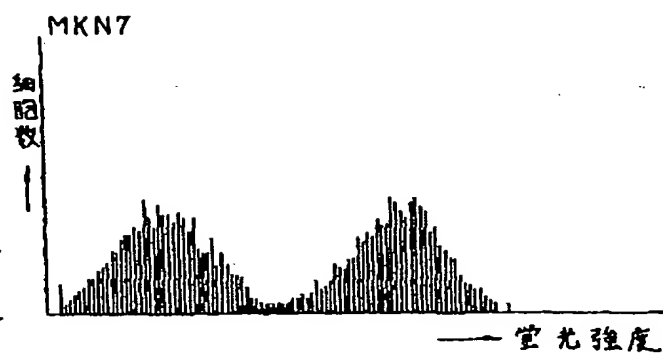
【第2図】



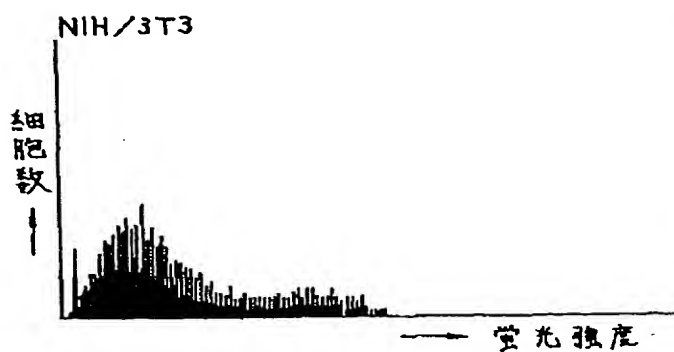
【第3A図】



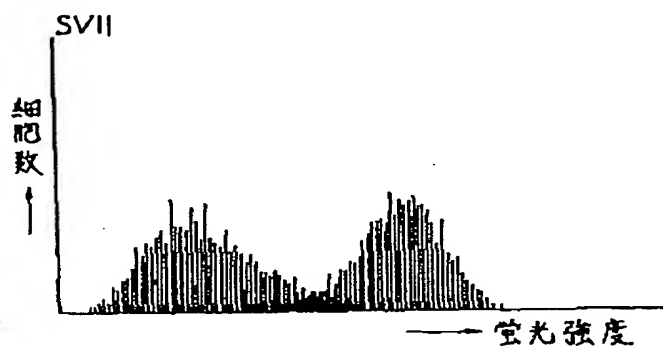
【第3B図】



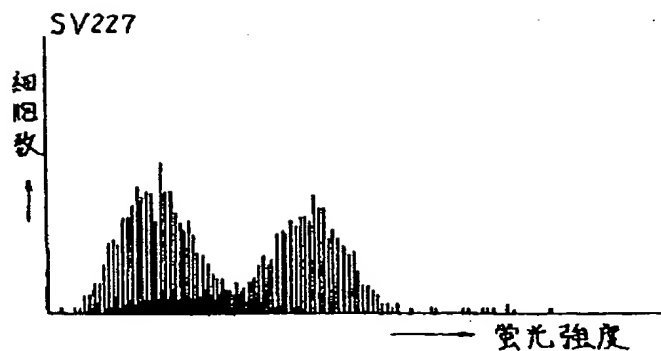
【第3C図】



【第3D図】



【第3E図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>°</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/574

C 1 2 N 5/00

B

33/577

C 1 2 N 15/00

C

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 益子 高  
宮城県仙台市太白区太白 2 丁目 9—3—  
202

(72)発明者 白石 真人  
東京都板橋区小茂根 4—24—9

(72)発明者 平川 忠  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号  
味の素株式会社中央研究所内

(72)発明者 房木 ノエミ  
東京都杉並区善福寺 2—14—24

(56)参考文献 Science, 232 [4756]  
(1986) P. 1644—1646